第 43 卷 增刊
2000 年 5 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43, Suppl.
May, 2000

文章编号：0454-6296（2000）增刊-0085-07

苏云金杆菌 δ-内毒素、芽孢及苏云金素 A 对棉铃虫毒性及拒食性的比较

张继红，王琛柱*
（中国科学院动物研究所，农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：苏云金杆菌库斯塔克变种 HD-1 的晶体蛋白与芽孢、HD-1 无晶体突变株（Cry⁻）的芽孢以及苏云金素 A 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 毒性和拒食性的比较研究显示，HD-1 晶体蛋白对棉铃虫的杀虫毒力高，拒食作用强；HD-1 芽孢对棉铃虫具有一定的杀虫活性和生长抑制作用，并有很强的拒食作用；HD-1 无晶体突变株（Cry⁻）芽孢对棉铃虫无毒也无拒食作用；苏云金素 A 对棉铃虫的生长发育有极显著的抑制作用，但对棉铃虫无拒食作用，由此证明晶体蛋白是苏云金杆菌杀虫活性和拒食作用的主要来源。苏云金素 A 与苏云金杆菌芽孢晶体混合物一起使用，可使棉铃虫的死亡率显著提高。

关键词：棉铃虫；苏云金杆菌；毒性；拒食性
中图分类号：Q965.9　　　**文献标识码**：A

苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*, Bt）是目前应用最广泛的昆虫病原微生物。它不仅具有杀虫活性，而且对很多昆虫具有显著的拒食作用[1,2]，后者在一定程度上影响到 Bt 的杀虫毒效。Bt 的致病因子主要包括晶体蛋白（即 δ-内毒素）、芽孢和 β-外毒素，有研究表明，芽孢和 β-外毒素的存在可提高晶体蛋白对昆虫的致病力[3~6]，但三者对昆虫拒食性的大小直接关系到昆虫对 Bt 摄入量的大小，影响 Bt 的杀虫效果。鉴于各因子的毒性和拒食性的关系目前尚缺乏系统的比较，为提高 Bt 的杀虫效果，我们主要以目前生产上常用的 HD-1 菌株和棉田重要害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 为材料，对晶体蛋白、芽孢以及苏云金素 A 的毒性和拒食性进行了比较研究，并探讨了苏云金素 A 与苏云金杆菌芽孢晶体混合粉的协同增效作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试虫：棉铃虫为室内人工饲养多代的标准试虫。养虫和试验条件为 27℃、相对湿度 75%、光照时间 15 h。成虫饲以 10% 的蜂蜜水溶液，卵产于纱布上。幼虫以人工饲料饲养，

基金项目：国家自然科学基金（39900099）和中国科学院重点项目（KZ952-S1-109）
* 通讯作者
收稿日期：1999-07-22；修订日期：2000-01-26

饲料主要含有熟大豆粉、酵母粉、麦胚粉、抗坏血酸、对羟基苯甲酸甲酯、山梨酸、琼脂等成分。

菌种：苏云金杆菌库斯塔克变种HD-1和HD-1无晶体突变株（Cry^-）在30℃培养箱中，以蛋白胨-牛肉膏固体培养基培养。HD-1菌液经离心洗涤后，直接冰冻干燥，即为芽孢晶体混合粉；晶体的制备同Zhang等[7]，纯度达99.23%；芽孢的制备同王瑛等[8]，其中HD-1芽孢纯度达98.5%。HD-1菌株和β-外毒素苏云金素A由中国科学院动物研究所昆虫病理组提供；Cry^-菌株由美国加州大学河边分校昆虫学系吴栋博士提供。

1.2 毒性测定

HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry^-）芽孢及苏云金素A分别以如下系列浓度：31.25 μg/mL，62.5 μg/mL，125 μg/mL，250 μg/mL，312.5 μg/mL及375 μg/mL掺入人工饲料中，每处理饲喂初孵幼虫60头，以正常人工饲料饲喂初孵幼虫90头作为对照。由于苏云金杆菌芽孢晶体制剂在田间的残效期约两天左右，我们在实验设计中只喂棉铃虫2日处理饲料，之后转至正常饲料上饲养，以测定棉铃虫取食2日处理饲料后对其生存和生长发育的后续效应。分别统计2日，5日幼虫死亡率，称量幼虫5日及12日体重以反映各处理饲料对棉铃虫生长发育的短期和长期影响。校正死亡率参照Abbot方法计算[9]。

1.3 有食物选择试验

1.3.1 4龄幼虫的拒食指数测定：处理饲料中，HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry^-）芽孢及苏云金素A浓度均为62.5 μg/mL，分别与对照正常饲料两两间隔置于9cm培养皿内，称取对照和处理饲料湿重。刚刚蜕皮的4龄幼虫饥饿24 h后放入培养皿内，每皿1头，每处理15个重复。培养箱内保持黑暗48 h。取食前，皿内饲料的放入量应大于幼虫48 h内的最大消耗量，各处理间基本相等。48 h后取出试虫，将培养皿放入50℃培养箱内，待剩余饲料烘干后，称取饲料干重。每种饲料另取4块，用于测定饲料干湿比。测定幼虫2日取食干重量，计算拒食指数（*DI*）。*DI*的计算公式：*DI*＝处理饲料取食量/(对照饲料取食量＋处理饲料取食量)。

1.3.2 初孵幼虫的趋性指数测定：处理饲料设置：HD-1晶体62.5 μg/mL，12.5 μg/mL；HD-1芽孢62.5 μg/mL，312.5 μg/mL；HD-1无晶体突变株（Cry^-）芽孢62.5 μg/mL，312.5 μg/mL；苏云金素A 62.5 μg/mL，312.5 μg/mL，分别与对照饲料两两间隔置于培养皿内。每皿放5头初孵幼虫，每处理10个重复。培养箱内保持黑暗72 h，于每日8:00和18:00时统计幼虫所在位置，计算幼虫趋性指数（*TI*）。*TI*的计算公式：*TI*＝分布在处理饲料上的幼虫数/(分布在处理饲料上的幼虫数＋分布在正常饲料上的幼虫数)。

1.4 无食物选择试验

处理饲料中，HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry^-）芽孢及苏云金素A的浓度均为62.5 μg/mL。刚刚蜕皮的4龄幼虫饥饿16 h，分别饲以正常饲料及上述处理饲料。每种饲料测试9头幼虫，每幼虫1 min观察一次，共观察45 min。棉铃虫取食行为划分为取食、活动和休息三类，划分标准如下：取食——幼虫口器接触饲料并有取食动作；活动——包括爬行、身体前部伸展或摇摆、口器呈咀嚼状但不接触饲料；休息——幼虫呈静止状。

1.5 苏云金素A与Bt芽孢晶体混合物的协同杀虫作用

浓度为0，31.25 μg/mL，250 μg/mL的苏云金素A分别与浓度0 μg/mL，31.25 μg/mL，

62.5 μg/mL,125 μg/mL 的 Bt 芽孢晶体混合物混配于人工饲料中，各处理初孵幼虫 60 头，2 日后转喂正常饲料。分别统计幼虫 2 日，5 日死亡率。

2 结果

2.1 毒性比较

饲喂 HD-1 晶体的棉铃虫组（简称晶体组）幼虫，在 2 日和 5 日内均表现为高死亡率，HD-1 芽孢组也有死亡，但死亡率较低；而 Cry⁻ 芽孢和苏云金素 A 组在 5 日内无幼虫死亡（表 1）。苏云金素 A 组幼虫在 12 日后仅有不到 10% 的个体死亡。

表 1　棉铃虫取食含苏云金杆菌 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株（Cry⁻）芽孢和苏云金素 A 人工饲料的校正死亡率

Table 1　The modified mortality of *H. armigera* larvae on the ingestion of HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry⁻ mutant spore, and thuringiensin A of *B. thuringiensis*

浓度 Concentration (μg/mL)	HD-1 晶体 HD-1 crystal		HD-1 芽孢 HD-1 spore		Cry⁻ 芽孢 Cry⁻ spore		苏云金素 A Thuringiensin A	
	2 日 2nd Day	5 日 5th Day	2 日 2nd Day	5 日 5th Day	2 日 2nd Day	5 日 5th Day	2 日 2nd Day	5 日 5th Day
31.25	45.61	68.40	8.33	8.17	0	0	0	0
62.5	40.68	80.25	5.45	3.68	0	0	0	0
125	57.89	85.12	10.94	13.91	0	0	0	0
250	55.17	96.34	25.00	27.60	0.02	0	0	0
312.5	52.54	94.62	12.28	23.79	0	0	0	0
375	66.10	98.21	20.00	38.20	0.04	0	0	0

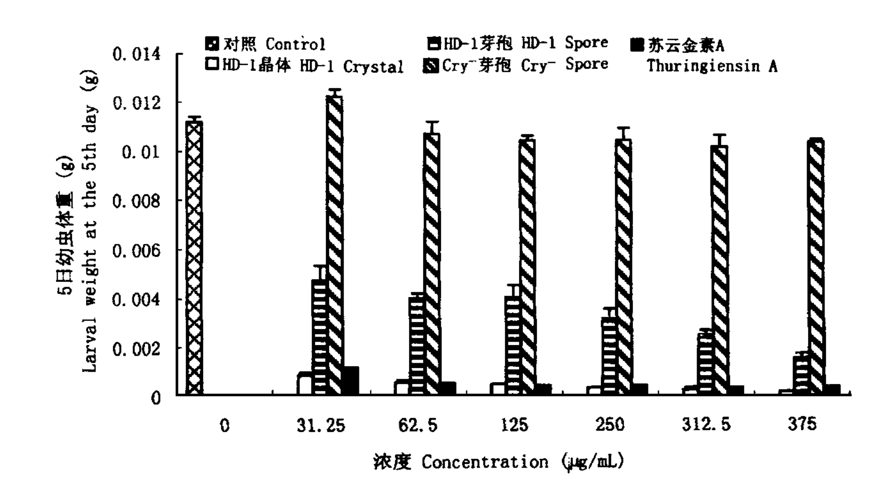


图 1　苏云金杆菌 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株（Cry⁻）芽孢和苏云金素 A 对棉铃虫幼虫生长发育的短期影响

Fig. 1　The short term effects of HD-1 Crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry⁻ mutant spore and thuringiensin A from *B. thuringiensis* on the growth and development of *H. armigera* larvae

5日后，除芽孢（Cry⁻）组外，各处理组幼虫的体重均显著降低。其中，取食HD-1晶体和苏云金素A的幼虫体重均低于正常幼虫体重的4%（图1）。12日后，HD-1晶体组幼虫大部分已死亡；苏云金素A组幼虫几乎没有生长，呈现两头尖中间鼓的畸形体态；HD-1芽孢组幼虫发育迟缓，体重显著低于对照组幼虫；HD-1无晶体突变株（Cry⁻）芽孢组幼虫体重与对照组幼虫无显著差异（图2）。

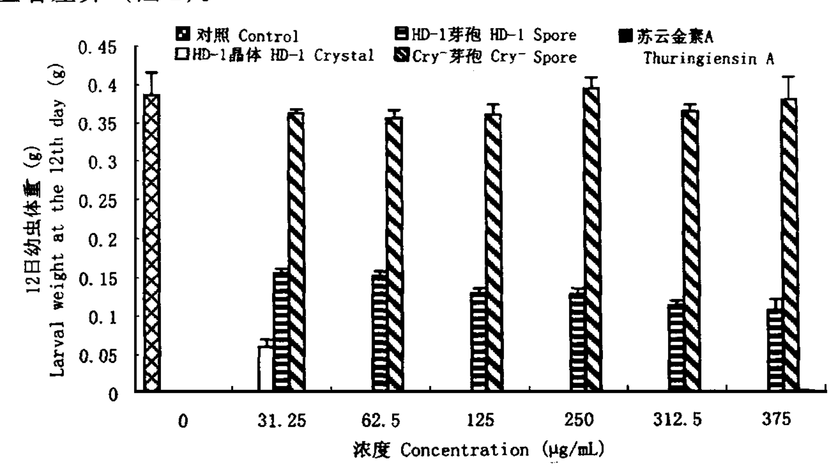


图2 苏云金杆菌HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry⁻）芽孢和苏云金素A对棉铃虫幼虫生长发育的长期影响

Fig. 2 The long term effects of HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry⁻ mutant spore and thuringiensin A from *B. thuringiensis* on the growth and development of *H. armigera* larvae

2.2 有食物选择条件下幼虫的取食反应

4龄幼虫的拒食指数（表2）和初孵幼虫在各处理饲料上的趋性指数（表3）都表明，棉铃虫对HD-1的晶体和芽孢有显著的拒食反应，对Cry⁻芽孢和苏云金素A无明显拒食反应。

表2 选择性实验中HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry⁻）芽孢和苏云金素A对棉铃虫4龄幼虫的拒食指数

Table 2 The deterrent index (*DI*) of the *H. armigera* fourth instar larvae against HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry⁻ mutant spore and thuringiensin A in the choice test

	HD-1晶体 HD-1 crystal	HD-1芽孢 HD-1 spore	Cry⁻芽孢 Cry⁻ spore	苏云金素A Thuringiensin A
拒食指数（*DI*） （Mean ± *SE*）	0.248 ± 0.079	0.248 ± 0.072	0.468 ± 0.096	0.5494 ± 0.095

2.3 无食物选择条件下幼虫的取食行为反应

棉铃虫在含Cry⁻芽孢、HD-1芽孢和外毒素饲料上的取食次数与正常饲料无显著差异，在含HD-1晶体饲料上的取食次数显著降低（图3）。

2.4 苏云金素A与Bt芽孢晶体混合物的协同杀虫作用

幼虫5日死亡率均高于2日死亡率。苏云金素A以31.25 μg/mL，250 μg/mL单独作用，

幼虫5日死亡率分别为0和1.8%。将苏云金素A与Bt芽孢晶体混合物一起使用，棉铃虫死亡率显著提高（图4）。

表3　选择性实验中棉铃虫初孵幼虫在处理饲料上的趋性指数

Table 3　The tactic index (*TI*) of *H. armigera* neonates to the treated diets in the choice test

处理饲料 Treated diets (μg/mL)	1日 1st Day		2日 2st Day		3日 3st Day	
	8:00*	18:00	8:00	18:00	8:00	18:00
HD-1 晶体（HD-1 Crystal）						
62.5	0.179	0.188	0.121	0.034	0.148	0.154
12.5	0.233	0.143	0.029	0.108	0.194	0.240
HD-1 芽孢（HD-1 Spore）						
62.5	0.180	0.200	0.227	0.195	0.207	0.286
312.5	0.294	0.111	0.119	0.132	0.206	0.194
Cry⁻芽孢（Cry⁻ Spore）						
62.5	0.418	0.502	0.424	0.412	0.446	0.410
312.5	0.476	0.525	0.536	0.547	0.517	0.537
苏云金素A（Thuringiensin A）						
62.5	0.429	0.500	0.436	0.343	0.476	0.350
312.5	0.351	0.300	0.323	0.441	0.474	0.393

* 观察时间（the time of observation）

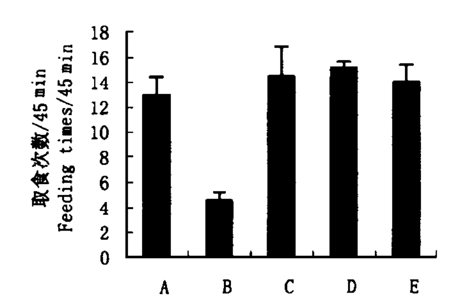


图3　棉铃虫4龄幼虫对HD-1晶体、HD-1芽孢、HD-1无晶体突变株（Cry⁻）芽孢和苏云金素A的取食行为反应

Fig. 3　The feeding behavior of the *H. armigera* fourth instar larvae on diets with HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry⁻ mutant spore and thuringiensin A

A. 对照（Control）; B.HD-1 晶体（HD-1 crystal）; HD-1 芽孢（HD-1 spore）; D. 无晶体突变株（Cry⁻）芽孢（Cry⁻ mutant spore）; E. 苏云金素A（Thuringiensin A）

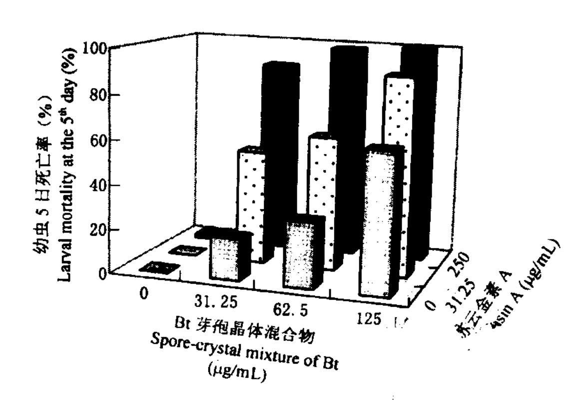


图4　苏云金素A对Bt芽孢晶体混合物的增效作用

Fig. 4　The potentiation of thuringiensin A on the toxicity of spore-crystal mixture of Bt

3　讨论

上述研究结果显示，HD-1晶体蛋白对棉铃虫的杀虫毒力最高，拒食作用也强，HD-1芽

孢对棉铃虫具有毒性，虽然其毒力较低，但在选择性实验中对棉铃虫的拒食作用与晶体蛋白不相上下；无晶体突变株（Cry^-）芽孢对棉铃虫既没有毒性，也没有拒食作用。有研究结果表明芽孢衣蛋白与晶体蛋白同源，具有一定的杀虫活性[10~12]。Du 等（1996）[13]报道，δ-内毒素保守的 C-末端和芽孢衣蛋白质都含有丰富的半胱氨酸，部分 δ-内毒素可通过二硫键附着在芽孢衣上。因此，晶体是苏云金杆菌杀虫活性和拒食作用的主要来源。

苏云金素 A 虽然对棉铃虫无明显急性致死效应，但对棉铃虫的生长发育有不可恢复的抑制作用，即使在测试的最低浓度，初孵幼虫的体重在 12 日内都没有明显的增长。苏云金素 A 对棉铃虫亦无明显拒食作用，还可大幅度增强苏云金杆菌芽孢晶体混合物的杀虫毒力。苏云金素 A 和晶体蛋白在杀虫特性上具有互补性，如苏云金素 A 作用效果比较缓慢，但性质稳定，持效时间较长，对棉铃虫无拒食作用；晶体蛋白的作用效果较快，但性质不稳定，残效期短，对棉铃虫有强的拒食作用。因此，将苏云金素 A 作为苏云金杆菌制剂的成分之一，可提高对害虫的毒杀效果，但在实际应用中，由于苏云金素对脊椎动物有一定毒性，应考虑到其安全性。目前一般认为，在实际用于害虫防治的浓度下，苏云金素不会对非靶标生物和人类构成危险[14]，有些国家已有商品制剂出售使用。

致谢 项秀芬女士和张书芳女士参与了部分生测工作，谨致谢意。

参 考 文 献 (References)

[1] Berdegué M, Trumble J T, Moar W J. Effect of CryIC toxin from *Bacillus thuringiensis* on larval feeding behavior of *Spodoptera exigua*. Entomol. Exp. Appl., 1996, 80: 389~401

[2] Ramachandran R, Raffa K F, Miller M J *et al*. Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) toxin in diet. Environ. Entomol., 1993, 22: 197~211

[3] Gardner W A. Enhanced activity of selected combinations of *Bacillus thuringiensis* and beta-exotoxin against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol., 1988, 81 (2): 463~469

[4] 林开春. 苏云金素与苏云金杆菌芽孢晶体混剂对小菜蛾的增效作用. 植物保护学报, 1995, 22 (1): 27~32

[5] Miyasono M, Inagaki S, Yamamoto M *et al*. Enhancement of δ-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus*
表 2 against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol., 1994, 63: 111~112

heltlu A M, van Rie J *et al*. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protoxin to resistant diamond-
e 2 Th... (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 564~569

J H, Wang C Z, Xiang X F *et al*. Effect of dissolution and degradation on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-toxins to cotton bollworm. Entomologia Sinica, 1997, 4 (4): 357~363

[8] 王 瑛, 白 成, 温 洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. 微生物学报, 1980, 20 (3): 285~288

[9] Abbot W S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 1925, 18: 265~267

[10] 李荣森, 罗 成. 苏云金杆菌伴孢晶体和芽孢孢衣的蛋白质组分及其与毒力的关系. 昆虫学报, 1989, 32 (2): 149~156

[11] Fast P G. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges H D ed. Microbial Control of Pests and Diseases, 1970－1980. London: Academic Press, 1981. 223~248

[12] Somerville H J, Delafied F P, Rittenberg S C. Biochemical homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 1968, 96: 721~726

[13] Du C, Nickerson K W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized CryIAc toxin: physiological and pathogenic consequences. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 3 722~3 726

[14] Marce F, Matha V, Weiser J. Analysis of the genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β-exotoxin by means of the *Drosophila wing spot test*. J. *Invertebr. Pathol.*, 1989, 53: 347～353

Comparison of toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hübner)

ZHANG Ji-hong, WANG Chen-zhu*

(National Key Laboratory of Integrated Management of Agricultural Insect Pests and Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: A comparative study on the toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hübner) was carried out. The parasporal crystals of Btk HD-1 were highly toxic and feeding deterrent to *H. armigera* larvae. The spores of Btk HD-1 showed some insecticidal activity and highly feeding deterrence. The spores of a HD-1 mutant without crystal, Cry^-, had no toxicity and feeding deterrence. The thuringiensin A greatly inhibited larval development, but had no feeding deterrence. In the no choice test, larval feeding was arrested by HD-1 crystals, but HD-1 spores, mutant Cry^- spores and thuringiensin A had no effect on larval feeding during the 45 min observation. When the crystal-spore mixture is combined with thuringiensin A, larval mortality was greatly increased.

Key words: *Helicoverpa armigera*; *Bacillus thuringiensis*; toxicity; deterrence

* Author for correspondence